



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47	A1	(11) 国際公開番号 WO99/63083  (43) 国際公開日 1999年12月9日(09.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02813  (22) 国際出願日 1999年5月28日(28.05.99)  (30) 優先権データ 特願平10/148579 1998年5月29日(29.05.98) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大正製薬株式会社 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo, (JP)  (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 池田明子(IKEDA, Akiko)(JP/JP) 山下 恵(YAMASHITA, Megumi)(JP/JP) 釣谷克樹(TSURITANI, Katsuki)(JP/JP) 吉本 真(YOSHIMOTO, Makoto)(JP/JP) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内 Tokyo, (JP) 荒瀬誠治(ARASE, Seiji)(JP/JP) 〒770-0005 徳島県徳島市南矢三町3丁目9番15号 Tokushima, (JP)		(74) 代理人 弁理士 北川富造(KITAGAWA, Tomizo) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社 特許部 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL GENE AND PROTEIN ENCODED THEREBY  (54)発明の名称 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質  <div style="text-align: center;"> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div style="width: 45%;"> <p>① 配列-1 b</p> <p>② 配列-2 c</p> <p>③ 配列-3 d</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>a ... ABOUT 1.5 kb</p> <p>b ... SEQUENCE-1</p> <p>c ... SEQUENCE-2</p> <p>d ... SEQUENCE-3</p> </div> </div> (57) Abstract A novel protein DERP2 originating in human hair papilla cells and having an effect of regulating the growth of hair; and a gene derp2 encoding the same. The gene derp2 encoding the novel protein DERP2 having an effect of regulating the growth of hair can be obtained by cloning from a cDNA library originating in human hair papilla cells. Because of having an effect of regulating the growth of hair, this protein is usable in developing hair growth promoting agents, etc.		

(57)要約

ヒト毛乳頭細胞由来の、毛髪の成長を調節する機能を有する新規蛋白質DERP2と、それをコードする遺伝子derp2を提供する。

ヒト毛乳頭細胞由来のcDNAライブラリーからのクローニングによって、毛髪の成長を調節する機能を有する新規蛋白質DERP2をコードする遺伝子derp2が得られる。該蛋白質は、毛髪の成長を調節する機能を有していることから、発毛促進剤等の開発に用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

## 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質

## 技術分野

本発明は、毛髪の成長を調節する機能を有する新規蛋白質DERP (dermal papilla derived protein) 2、ならびに該蛋白質をコードする遺伝子derp2に関するものである。

## 背景技術

ヒト毛髪の毛包には、角化細胞、毛乳頭細胞、繊維芽細胞および脂腺細胞等の様々な上皮系および真皮系の細胞が存在しており、毛周期（毛髪の成長サイクル）は、これらの細胞間相互作用を介して調節されている。

これらの細胞の中で、毛髪繊維を産生するのは毛包角化細胞であるが、この細胞の増殖と分化の調節に中心的な役割を担っているのは毛乳頭細胞であると考えられている。すなわち、毛乳頭細胞が毛周期のコントローラーとして機能すると考えられている。以上の背景から、現在、毛乳頭を中心とした毛周期調節機構の解析が盛んに行われているが、毛髪成長の分子メカニズムはまだほとんど明らかにされていない。

男性型脱毛症は、毛包にアンドロジェンが過剰に作用することにより進展することが知られている。アンドロジェンは毛の成長を調節する最も重要な因子であるが、その作用メカニズムはまだ解明されていない。

毛乳頭細胞はアンドロジェン受容体およびテストステロン代謝酵素である5 $\alpha$ -リダクターゼを高発現していること、さらに毛乳頭細胞におけるアンドロジェン受容体の発現量が発毛部より禿頭部において高いことから、毛包におけるアンドロジェンの主なターゲット細胞は毛乳頭細胞であると考えられている。すなわち、アンドロジェンは、毛乳頭に作用し、毛乳頭細胞由来の因子等の産生量を変化させることにより、毛髪の成長を調節すると考えられている。

以上の様な知見から、アンドロジェンにより産生量が増加する毛乳頭由来の因子が、毛髪の成長に重要な役割を果たしていることが予測されているが、この因子が何なのかはまだ明らかにされていない。

上述のように、毛乳頭由来の毛髪成長に關与する因子、特に蛋白性因子は、毛髪促進作用を示す生理活性物質の探索に極めて有用である。本発明は、発毛に關する分子機構を解明する過程で、この様な毛髪成長を調節することのできる新規な蛋白質とその遺伝子を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは毛髪成長に關与する因子の同定を目的とし、ヒト毛乳頭細胞で高発現している遺伝子の中から、所望の蛋白質を把握するべく鋭意研究の結果、新規蛋白質DERP2の存在と、それをコードする遺伝子derp2の単離に成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、(a)配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または(b)配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ毛髪成長を調節する機能を有する蛋白質に關するものである。さらに本発明は、(c)配列番号：2に記載のDNAからなる遺伝子、または、(d)配列番号：2のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ毛髪成長を調節する機能を有する蛋白質をコードするDNAからなる遺伝子に關するものである。

本発明であるDERP2は、配列番号1に示すように全345アミノ酸残基からなる分子量37キロダルトン(kd)の蛋白質である。そのアミノ酸配列上の特徴として、疎水性アミノ酸に富む領域が複数箇所認められることから、膜蛋白質の一種であると推察される。

また、もう一つの本発明であるderp2は、配列番号2に示すように1035塩基対(bp)からなる遺伝子である。

遺伝子derp2は、ヒト毛乳頭細胞由来のcDNAライブラリーから、該遺伝子を含んだcDNA断片として単離することができる。本発明者らが使用したcDNAライブラリーは、Messengerらの方法(Br. J. Dermatol. 114, 425, 1986)に従って分離したヒト毛乳頭細胞から一般的な方法に従って抽出したmRNAを基に調製したものであるが、クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAを元にしても同様にcDNAを調製することができる。

ヒト毛乳頭細胞で高発現している遺伝子を識別する方法として、大久保らの方

法 (Okubo et al., Nature Genet., 2, p173, 1992) による、遺伝子の発現頻度を解析する方法を用いることができる。具体的には、以下の手順による。

ヒト毛乳頭細胞由来の mRNA を鋳型とし、適当な制限酵素で開環させたベクタープラスミドの一端にオリゴ d T を結合させたものをプライマーとして c DNA 合成を行った後、制限酵素 M b o I と制限酵素 B a m H I で切断する。当該ベクターは d a m メチラーゼ陽性の大腸菌を宿主として調製されたため、M b o I の認識配列である「G A T C」の A 残基がメチル化されている。従って M b o I は、新たに合成された c DNA 部分のみを切断する。当該ベクターは、オリゴ d T を結合させた末端とは反対側の末端近傍に B a m H I 切断部位を 1 ヶ所だけ有しているので、本酵素は当該ベクターを 1 ヶ所切断し、さらに新たに合成された c DNA 部分にもし B a m H I 認識配列が存在すれば、その部位も切断する。B a m H I と M b o I は「G A T C」なる配列からなる、同一の付着端を生ぜしめるため、両酵素で切断した後、DNA リガーゼを作用させれば、プラスミドを開環することができる。このようにして調製したプラスミドを用いて、大腸菌を形質転換することで 3' 末端 c DNA ライブラリーを構築した。従って当該ライブラリーは、各 mRNA の 3' 端のポリ A 部位から、その 5' 側部分のうち最初に G A T C なる塩基配列が出現する部位までの領域を含んでいる。当該 3' 末端 c DNA ライブラリーから無作為に適当個数の組換え体を選択し、各組換え体中の c DNA 断片の全塩基配列を決定する。このようにして決定された特定配列を有する c DNA 断片が、無作為に選択された組み換え体の中から幾つ確認されるかをもって、臓器特異的遺伝子及び高発現遺伝子を識別することができる。

上記の高発現遺伝子を識別する方法では、無作為に選択する組み換え体の総数は数百から千程度が適当であるが、必要ならばそれ以上の個数の組み換え体进行处理すればよい。

本発明者らは上記方法を実施し、789 個の組み換え体中の c DNA 断片の塩基配列を全て決定し、その中から、同一の配列を有する c DNA としての出現頻度が 3/789 であった c DNA 断片を、ヒト毛乳頭細胞で高発現している遺伝子の DNA 断片の候補として選別した。

上記 c DNA 断片は前述したとおり、mRNA の 3' 端の一部の領域しか含んでいない。そこで本発明者らは当該領域（以下 3' 断片）の塩基配列情報を元に

して、全鎖長 cDNA を取得した。

クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質 cDNA ライブラリーを鋳型とし、上記 3' 断片内の配列を有する適当な長さのオリゴヌクレオチドとベクター中の配列を有する同程度の長さのオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し、これらをプライマーとして PCR を行った。その結果、約 1.5 kb の DNA 断片を増幅することができた。この際、ヒト培養毛乳頭細胞から常法に従って抽出した mRNA を鋳型とし、クローンテック社またはギブコ社の 5' RACE キットを用いることによっても行うことができる。さらにこれはまた、上記 3' 断片をプローブとして、上記ヒト大脳皮質または毛乳頭細胞 cDNA ライブラリーを、コロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションで、常法に従ってスクリーニングすることによっても行うことができる。

上記方法によって増幅した cDNA 断片は、プロメガ社から市販されているベクター pGEM-T に組み込み、全塩基配列を決定した。この際、組換え DNA を独立に 2 クローン取得して、それぞれの cDNA 断片の塩基配列を決定することにより、配列の確認を行った。この配列中に一つの蛋白質翻訳領域 (Open Reading Frame, ORF) を見だし、この遺伝子を *derp2*、該遺伝子にコードされる蛋白質を *DERP2* と命名した。

遺伝子 *derp2* は、適当な宿主ベクター系による一般的な遺伝子組み換え技術によって、組み換え遺伝子とすることができる。適当なベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pUC118 その他)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pC194 その他)、酵母由来のプラスミド (例、pSH19 その他)、さらにバクテリオファージやレトロウィルスやワクシニアウィルス等の動物ウィルス等が利用できる。組み換えに際しては、適当な合成 DNA アダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを付加することも可能である。さらに該遺伝子を発現させるために、遺伝子の上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7 プロモーター、*lac* プロモーター、*trp* プロモーター、 $\lambda$  PL プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合には SPO 系プロモーター等が、宿主が酵母である場合には PHO5 プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター等が、宿主が動物細

胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウィルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

また該遺伝子を他の蛋白質（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインAその他）との融合蛋白質として発現させることも可能である。このようにして発現させた融合型DERP2は、適当なプロテアーゼ（例、トロンビンその他）を用いて切り出すことが可能である。

DERP2の発現の際に利用できる宿主としては、エシェリヒア属菌であるEscherichia coliの各種菌株、バチルス属菌であるBacillus subtilisの各種菌株、酵母としてはSaccharomyces cerevisiaeの各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞等が利用できる。上記組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、常法または各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法が適用できる。

尚、本発明においては、配列番号2に示した塩基配列の他に、該配列とハイブリダイズしかつ毛髪成長を調節する機能を有する蛋白質をコードするDNAも、本発明の範囲内である。

すなわち、遺伝子derp2の全長配列において、種々の人為的処理、例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が遺伝子derp2とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ毛髪成長を調節する機能を有する蛋白質をコードするDNAであれば、配列番号2に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内のものである。

上記のDNA変異の程度は、遺伝子derp2のDNA配列と90%以上の相同性を有するものであれば許容範囲内である。また、遺伝子derp2とハイブリダイズする程度としては、通常の条件下（例えばDIG DNA Labeling kit、ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1175033）でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液（ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1603558）中でハイブリダイズさせ、50℃の0.5×SSC溶液（0.1% [w/v] SDSを含む）中でメンブレンを洗浄する条件（1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである）でのサザンハイブリダイゼーション

で、遺伝子 *derp2* にハイブリダイズする程度であればよい。

また、上記のごとく遺伝子 *derp2* と相同性の高い変異体遺伝子にコードされる蛋白質であって、毛髪の成長を調節する機能を有する蛋白質もまた、本発明の範囲内のものである。

すなわち、新規蛋白質 *DERP2* のアミノ酸配列の1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体であっても、該変異体が毛髪の成長を調節する機能を有する蛋白質であれば、該変異体は本発明の範囲内のものである。

蛋白質の構成要素となるアミノ酸の側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおいてそれぞれ異なるものであるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造（立体構造とも言う）に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つかの関係が、経験的にまた物理化学的な実測により知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン（*Gly*）とプロリン（*Pro*）、*Gly*とアラニン（*Ala*）またはバリン（*Val*）、ロイシン（*Leu*）とイソロイシン（*Ile*）、グルタミン酸（*Glu*）とグルタミン（*Gln*）、アスパラギン酸（*Asp*）とアスパラギン（*Asn*）、システイン（*Cys*）とスレオニン（*Thr*）、*Thr*とセリン（*Ser*）または*Ala*、リジン（*Lys*）とアルギニン（*Arg*）、等が挙げられる。

従って、配列番号1に示した新規蛋白質 *DERP2* のアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、その変異が *DERP2* 蛋白質の3次元構造において保存性が高い変異であって、その変異蛋白質が *DERP2* と同様に毛髪の成長を調節する機能を有する蛋白質であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。変異の程度としては、配列番号1に示したアミノ酸配列との相同性が、90%以上のものが許容し得る範囲である。

#### 産業上の利用可能性

*DERP2* が毛髪の成長を調節する機能を有していることから、遺伝子 *derp2* の発現異常や *DERP2* の活性発現異常は、毛髪の成長に影響を与えるものと推測される。そのため、当該遺伝子の発現を調節する物質や *DERP2* の機能を調節する物質は、発毛剤または育毛剤として期待され得るものであり、遺伝子 *derp2* や蛋白質 *DERP2* は、このような生理活性物質の探索に利用すること



ができる。例えば、遺伝子 *derp 2* の転写発現系中に被験物質を同時に存在させ、遺伝子 *derp 2* の発現量を PCR 等の適当な方法で検出することにより、被験物質の遺伝子発現に与える影響を調べることができる。また、DERP 2 に直接作用して、DERP 2 の毛髪の成長を調節する機能を制御する生理活性蛋白質の検索も行うことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例を挙げて詳述する。尚、以下特に断らない限り、実施例で示す各種実験方法、例えば組み換え体 cDNA の抽出や cDNA の塩基配列の決定等は、いずれも当業者にとって自公知の各種方法 (Molecular Cloning, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989、その他当業者にとって標準的な方法を紹介した技術解説書等に記載の方法) により行った。

#### 実施例 遺伝子 *derp 2* のクローニング

##### 1) 毛乳頭細胞の分離と培養

ヒト毛乳頭細胞は、健常人男性 (30 才) の発毛部頭皮の毛包から Messenger らの方法 (Br. J. Dermatol. 114, 425, 1986) に従って分離し、培養した。毛包下部から毛乳頭を取り出し、12% 牛胎児血清 (FBS) を添加した MEM 培地を入れたシャーレに設置し、5% CO<sub>2</sub> / 95% air、37℃ の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 7 日間培養した。毛乳頭からアウトグロウスしてきた細胞を、0.05% トリプシン - 0.53 mM EDTA 溶液を用いて回収した。分離した毛乳頭細胞は同培地で継代培養を行い、継代 4 回目および 5 回目の細胞を実験に用いた。

##### 2) 遺伝子の部分配列の決定

ヒト毛乳頭細胞由来の mRNA を鋳型として、大久保らの方法 (Okubo et al. Nature Genet., 1992, 2, p173) に従い、3' 末端 cDNA ライブラリーを作成した。当該ライブラリーから無作為に 789 個の組換え体を選択し、cDNA 部分の塩基配列を決定した。配列決定には DNA シークエンサー (ABI 社製 PRISM377) と同社製反応キットを用いた。

789 個の組み換え体中の各 DNA 断片の発現頻度を解析した結果、第 1 図に示す配列 (配列 - 1) を有する遺伝子の発現頻度が 3 / 789 であった。

### 3) 配列-1を含むcDNA断片のクローニング

配列-1を含むcDNA断片のクローニングを以下の方法により行った。まず、配列-1の一部分と逆相補鎖となるオリゴヌクレオチド(第1図の配列-2)を、DNA合成機(ABI社製380B)で合成した。次いで、ラムダファージクローニングベクター( $\lambda$ DR2)のcDNA挿入部位近傍の配列を有するオリゴヌクレオチド(第1図の配列-3)を、同様に合成した。 $\lambda$ DR2をクローニングベクターとする、Human Brain cerebral cortex 5'-STRETCH cDNA library(クロンテックラボラトリーズ社製)を鋳型とし、配列-2のオリゴヌクレオチドと配列-3のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、さらにタカラLA PCR Kit Ver. 2とPCRサーマルサイクラーMP(いずれも宝酒造製)を用いて、以下のPCR操作を行った。

cDNA library( $\geq 108$ pfu/ml)	5 $\mu$ l
10 $\times$ PCRバッファー(25mM Mg++を含む)	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M 配列-2	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M 配列-3	2 $\mu$ l
水	34.5 $\mu$ l
LA Taqポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

PCRサイクルは、94℃で2分保持後、98℃で20秒間反応させ、68℃まで-1℃/2秒の速度で冷却し、68℃で3分保持し、更に72℃で10分間保持を30回繰り返して行った。

上記方法により、配列-1を有するDNA断片(約1.5 kb)を特異的に増幅させた(第2図)。

### 4) 塩基配列決定用ベクターへのサブクローニング

3)で増幅したDNA断片を、アガロースゲル電気泳動(ゲル濃度1%)で分画した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、紫外光照射して目的とするバンドを含むゲルを切り出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出と精製は、GENECLEAN II Kit(バイオ101社製)を用いて行った。

この抽出精製したDNA断片を、塩基配列決定用ベクターpGEM-T(プロメガ社

製) にサブクローニングした (第 3 図)。Ligation 溶液はタカラ DNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造製) を用い、以下の組成で 16℃ で 1.5 時間反応させた。

抽出精製した DNA 断片	1 $\mu$ l (50ng)
pGEM-T	1 $\mu$ l (17ng)
水	3 $\mu$ l
Ligation 溶液	5 $\mu$ l
総量	10 $\mu$ l

上記反応後の溶液を用いて、大腸菌 K12 株 DH5 の形質転換を行った。形質転換体をアンピシリン (Amp) 50  $\mu$ g/ml、5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside 40  $\mu$ g/ml、Isopropyl- $\beta$ -D-Thio-Galactopyranoside 100  $\mu$ M を含有する LB 寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩培養した。

上記プレートに出現したコロニーを 50  $\mu$ g/ml の Amp を含む LB 液体培地 10 ml に接種して 37℃で一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit (キアゲン社製) で組換え DNA を精製した。

##### 5) DNA 断片の塩基配列の決定

塩基配列決定には DNA シークエンサー (ABI 社製 PRISM377) を用い、ダイターミネーター法を用いた。決定された塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウオーキング法で両鎖の全塩基配列を決定した (第 4 図)。当該クローンの cDNA の全塩基配列を配列番号 3 に示す。当該塩基配列が配列 - 2 及び配列 - 1 のうち配列 - 2 の上流領域を含んでいたことから、目的とする遺伝子 *derp2* がクローニングされたことを確認した。

当該 cDNA は 345 残基より成る蛋白質 (DERP2) をコードする ORF を含んでいる (配列番号 3)。該蛋白質の開始コドンであるメチオニン残基の上流域に同じ reading frame で終止コドンが出現したことから、当該 cDNA 断片がコードする蛋白質のアミノ酸配列は配列番号 3 に示したものが唯一のものであることが確認された。

##### 試験例 1 毛乳頭細胞の抗体染色

###### 1) 抗 DERP2 ペプチド抗体の調製

抗ペプチド抗体は、細胞工学別冊抗ペプチド抗体実験プロトコル (大海忍、

辻村邦夫著、秀潤社）に従って作成した。DERP2のアミノ酸配列の一部を含むペプチド（第1図の配列-4）を、ペプチドシンセサイザー（ABI社製）を用いて合成し、これをキャリア蛋白質ヘモシアニンにマレイミド法で架橋して抗原とした。この抗原0.5mgをウサギ（Kb1: JW、10歳、オス）の背部皮下に注入した。初回免疫後14、28、42日後に同量の抗原を用いて更に免疫を行い、初回免疫から52日目に全血を採取した。抗血清から、硫酸アンモニウム塩析法により粗IgG画分を調製し、さらにプロテインAセファロースカラム、続いて抗原ペプチド固定化カラムを用いてアフィニティー精製を行い、抗原特異的な抗体を取得した。この抗体は、*in vitro* 転写翻訳システム（プロメガ社製）を用いて翻訳合成したDERP2に特異的に結合した。また、毛乳頭細胞を1mM SDS溶液に溶解して調製した蛋白質溶液に存在する37kdの蛋白質と特異的に結合した。

## 2) 抗DERP2ペプチド抗体を用いた毛乳頭細胞の抗体染色

実施例1で分離培養した毛乳頭細胞を、8穴チャンバースライド（Nunc）に $1.5 \times 10^4$  cells/wellとなるように播種し、12% FBSを添加したMEM培地中で、一晚培養した。培地を除去し、細胞を4%パラホルムアルデヒド-0.25% Tween 20を用いて室温で15分間固定した。これを抗DERP2ペプチド抗体 $5 \mu\text{g/ml}$ で4℃、一晚処理し、更にビオチン化抗ラビットIgG抗体を反応させた後、AEC staining kit（シグマ社製）で発色させた。その結果を第5図に示した。毛乳頭細胞の核周辺のオルガネラ（ER-Golgiの領域）が強く染色された。

## 試験例2 毛乳頭細胞におけるderp2の発現

実施例で分離培養した健常人男性（30才）発毛部由来の毛乳頭細胞、および同様の方法で分離した男性型脱毛症患者男性（34才）禿頭部由来の毛乳頭細胞から、常法により全RNAを抽出した。各全RNA $1 \mu\text{g}$ を、DNaseI（Gibco BRL）1ユニット（U）で処理した後、Oligo(dT)12-18 Primer（GIBCO BRL）およびSuperscriptII（GIBCO BRL）を用いて、SuperscriptII添付のプロトコールに従い、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型とし、DNA合成機（ABI社製380B）で合成したderp2特異的なプライマー（第1図の配列-5および6）を用いて、全量 $40 \mu\text{l}$ として以下のPCRを行った。

cDNA	40ng
Ex taq buffer (Takara)	×1
dNTPs (Takara)	0.16mM
[ $\alpha$ -32P]-dCTP (NEN)	590kBq
Ex Taq (Takara)	2 U
配列-5	0.2 $\mu$ M
配列-6	0.2 $\mu$ M

PCRサイクルは、94℃で2分間加熱後、94℃30秒、60℃30秒、72℃1分を18サイクル繰り返した。

この反応液6  $\mu$ lを、12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ゲルを乾燥後、BAS-2000II（フジフィルム）にて、増幅されたderp2断片に取り込まれた放射能を測定した。derp2 mRNA量は、測定した放射能を増幅産物中のdCTP含量で補正後、内部標準として用いたLibosomal protein S26に対する相対値として表した。その結果を第6図に示す。

男性型脱毛症患者禿頭部由来の毛乳頭細胞では、健常人発毛部由来の毛乳頭細胞と比較して、derp2 mRNAの発現が高かった。

### 試験例3 テストステロン処理による遺伝子derp2の発現変化

実施例1と同様の方法で、男性型脱毛症患者男性（38才）発毛部由来の毛乳頭細胞を分離培養した。継代5回目の細胞を、 $2 \times 10^5$  cells / 6 cmシャーレにとなるように播種し、コンフルエントに達するまで培養した。その後、培地をテストステロン添加培地（0、10、50、250 nM）と交換して、24～72時間さらに培養した。培地を除去後、細胞をPBS（-）で洗浄し、全RNAを抽出した。実施例1の5）と同様にして調製したcDNA 40 ngを鋳型とし、配列-5および配列-6をプライマーとして、全量20  $\mu$ lで以下のPCRを行った。

cDNA	40ng
Ex taq buffer (Takara)	1x
dNTPs (Takara)	0.5mM
Ex Taq (Takara)	1U
配列-5	0.5 $\mu$ M

配列 - 6 0.5  $\mu$ M

PCRサイクルは、95℃で2分間加熱後、95℃30秒、60℃30秒、72℃1分を23サイクル繰り返した。

この反応液を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色した。結果を第7図に示す。50 nM以上のテストステロンを添加した培養により、毛乳頭細胞における遺伝子 *derp2* の発現量が増加することが確認された。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例で使用した核酸、もしくはペプチドを示す。

配列 - 1 は、ヒト毛乳頭細胞から大久保らの方法により得られる3'末端 cDNAライブラリーから、3/789の頻度で確認されるDNA断片の塩基配列を表わす。

配列 - 2 は、配列 - 1 の一部分の逆相補鎖の配列を示す。

配列 - 3 は、ラムダファージクローニングベクターの cDNA 挿入部近傍の配列を有するオリゴヌクレオチドの配列を示す。

配列 - 4 は、抗DERP2ペプチド抗体を調製するために使用した、DERP2の部分配列を含む抗原ペプチドの配列を示す。

配列 - 5 は、*derp2* をPCRで増幅するための部分配列である。

配列 - 6 は、*derp2* をPCRで増幅するための部分配列である。

第2図は、配列 - 1 を含む cDNA ライブラリーに対するPCRを示す。

第3図は、クローニングベクターpGEM Tに遺伝子 *derp2* を組み換えるスキームを示す。

第4図は、プライマーウォーキング法の概略を示す。

第5図は、抗DERP2ペプチド抗体を用いて、分離培養した毛乳頭細胞を免疫染色した図を示す。

第6図は、健常人男性発毛部由来の毛乳頭細胞および男性型脱毛症患者禿頭部由来の毛乳頭細胞での、遺伝子 *derp2* の発現量を比較した図を示す。

第7図は、各種濃度のテストステロンの存在下での、遺伝子 *derp2* の発現を示した図を示す。

## 配 列 表

## S E Q U E N C E   L I S T I N G

&lt;110&gt; TAISHO PHARMACEUTICAL CO., Ltd.

&lt;120&gt; Dermal Papilla Derived Protein 2

&lt;130&gt; P482

&lt;150&gt; JP10-148579

&lt;151&gt; 1998-05-29

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapience

&lt;400&gt; 1

Met Leu Ala Ala Arg Leu Val Cys Leu Arg Thr Leu Pro Ser Arg

5

10

15

Val Phe His Pro Ala Phe Thr Lys Ala Ser Pro Val Val Lys Asn

20

25

30

Ser Ile Thr Lys Asn Gln Trp Leu Leu Thr Pro Ser Arg Glu Tyr  
35 40 45

Ala Thr Lys Thr Arg Ile Gly Ile Arg Arg Gly Arg Thr Gly Gln  
50 55 60

Glu Leu Lys Glu Ala Ala Leu Glu Pro Ser Met Glu Lys Ile Phe  
65 70 75

Lys Ile Asp Gln Met Gly Arg Trp Phe Val Ala Gly Gly Ala Ala  
80 85 90

Val Gly Leu Gly Ala Leu Cys Tyr Tyr Gly Leu Gly Leu Ser Asn  
95 100 105

Glu Ile Gly Ala Ile Glu Lys Ala Val Ile Trp Pro Gln Tyr Val  
110 115 120

Lys Asp Arg Ile His Ser Thr Tyr Met Tyr Leu Ala Gly Ser Ile  
125 130 135

Gly Leu Thr Ala Leu Ser Ala Ile Ala Ile Ser Arg Thr Pro Val  
140 145 150

Leu Met Asn Phe Met Met Arg Gly Ser Trp Val Thr Ile Gly Val  
155 160 165

Thr Phe Ala Ala Met Val Gly Ala Gly Met Leu Val Arg Ser Ile  
170 175 180



Pro Tyr Asp Gln Ser Pro Gly Pro Lys His Leu Ala Trp Leu Leu  
 185 190 195

His Ser Gly Val Met Gly Ala Val Val Ala Pro Leu Thr Ile Leu  
 200 205 210

Gly Gly Pro Leu Leu Ile Arg Ala Ala Trp Tyr Thr Ala Gly Ile  
 215 220 225

Val Gly Gly Leu Ser Thr Val Ala Met Cys Ala Pro Ser Glu Lys  
 230 235 240

Phe Leu Asn Met Gly Ala Pro Leu Gly Val Gly Leu Gly Leu Val  
 245 250 255

Phe Val Ser Ser Leu Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Thr Thr Val  
 260 265 270

Ala Gly Ala Thr Leu Tyr Ser Val Ala Met Tyr Gly Gly Leu Val  
 275 280 285

Leu Phe Ser Met Phe Leu Leu Tyr Asp Thr Gln Lys Val Ile Lys  
 290 295 300

Arg Ala Glu Val Ser Pro Met Tyr Gly Val Gln Lys Tyr Asp Pro  
 305 310 315

Ile Asn Ser Met Leu Ser Ile Tyr Met Asp Thr Leu Asn Ile Phe  
 320 325 330

Met Arg Val Ala Thr Met Leu Ala Thr Gly Gly Asn Arg Lys Lys

335

340

345

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1035

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapience

&lt;400&gt; 2

10	20	30	40	50	60	
atgttggctg	caaggctggi	ggtctccgg	acactacctt	ctagggtttt	ccaccagct	60
ttcaccaagg cctccccgtg tgtgaagaat tccalcacga agaalcaatg gcigttaaca						120
cctagcaggg aataigccac caaaacaaga attgggatcc ggcgtgggag aactggccaa						180
gaactcaaag aggcagcatt ggaaccaatcg atggaaaaaa tatitaaaat tgaicagatg						240
ggaagaatgt tigtgtctgg aggggctgct gtgggtcttg gagcatttg ctactatggc						300
ttgggactgt ctaatgagat tggagctatt gaaaaggctg taatttggcc tcagtatgtc						360
aaggatagaa ttcatccac ctatagtac ttagcaggga gtaattgttt aacagctttg						420
tcigccatag caatcagcag aacgccgtt ccatgaact tcatgatgag aggcctcttg						480
gtgacaattg gtgtgacctt tgcagccaat gtggagctg gaatgcctgt acgatcaata						540

ccataigacc agagcccagg cccaaagcal cllgcilggi lgcacatic lggigigalg 600

ggigcagigg lggcicccici gacaalatta gggggicctc ttcicaticag agcigcalgg 660

tacacagctg gcatlgtggg aggccicicc actlgtggcca lglglgcgcc caglgaaaag 720

tttcigaaca lggglgcacc cclgggaglg ggcclgggic tgciclllgi gtccicatl 780

ggaiclatgi ttcttccacc taccaccglg gclggigcca ctcillacic agtggcaatg 840

lacgglggal tagttcilll cagcatglc ctcicglatg alaccagaa agtaatcaag 900

cgigcagaag talcaccaat glatggagll caaaaatag alcccatlaa ctgaltgctg 960

aglatclaca lggatacatt aaatataill atgcgagllg caactatgcl ggcaacigga 1020

ggcaacagaa agaaa 1035

<210> 3

<211> 1268

<212> DNA

<213> Homo sapience

<400> 3

aacigcgagg cgaaggigac cggggaccga gcatllicaga tclgcicggi agaccigglg 60

caccaccacc atg ttg gcl gca agg clg gtg lgl ctc cgg aca cta cct tct 112

Met Leu Ala Ala Arg Leu Val Cys Leu Arg Thr Leu Pro Ser									
1	5	10							
agg gtt ttc cac cca gct ttc acc aag gcc tcc cct gtt gtg aag aat	160								
Arg Val Phe His Pro Ala Phe Thr Lys Ala Ser Pro Val Val Lys Asn									
15	20	25	30						
tcc atc acg aag aat caa tgg ctg tta aca cct agc agg gaa tat	205								
Ser Ile Thr Lys Asn Gln Trp Leu Leu Thr Pro Ser Arg Glu Tyr									
35	40	45							
gcc acc aaa aca aga att ggg atc cgg cgt ggg aga act ggc caa	250								
Ala Thr Lys Thr Arg Ile Gly Ile Arg Arg Gly Arg Thr Gly Gln									
50	55	60							
gaa ctc aaa gag gca gca ttg gaa cca tcg atg gaa aaa ata ttt	295								
Glu Leu Lys Glu Ala Ala Leu Glu Pro Ser Met Glu Lys Ile Phe									
65	70	75							
aaa att gat cag atg gga aga tgg ttt gtt gct gga ggg gct gct	340								
Lys Ile Asp Gln Met Gly Arg Trp Phe Val Ala Gly Gly Ala Ala									
80	85	90							
gtt ggt ctt gga gca ttg tgc tac tat ggc ttg gga ctg tct aat	385								
Val Gly Leu Gly Ala Leu Cys Tyr Tyr Gly Leu Gly Leu Ser Asn									
95	100	105							
gag att gga gct att gaa aag gct gta att tgg cct cag tat gtc	430								
Glu Ile Gly Ala Ile Glu Lys Ala Val Ile Trp Pro Gln Tyr Val									
110	115	120							

aag gal aga att cat tcc acc tat atg tac tta gca ggg agt att	475
Lys Asp Arg Ile His Ser Thr Tyr Met Tyr Leu Ala Gly Ser Ile	
125 130 135	
ggc tta aca gct ttg tct gcc ata gca atc agc aga acg cct gtt	520
Gly Leu Thr Ala Leu Ser Ala Ile Ala Ile Ser Arg Thr Pro Val	
140 145 150	
ctc atg aac ttc atg atg aga ggc tct tgg gtg aca att ggt gtg	565
Leu Met Asn Phe Met Met Arg Gly Ser Trp Val Thr Ile Gly Val	
155 160 165	
acc ttt gca gcc atg gtt gga gct gga atg ctg gta cga tca ata	610
Thr Phe Ala Ala Met Val Gly Ala Gly Met Leu Val Arg Ser Ile	
170 175 180	
cca tat gac cag agc cca ggc cca aag cat ctt gct tgg ttg cta	655
Pro Tyr Asp Gln Ser Pro Gly Pro Lys His Leu Ala Trp Leu Leu	
185 190 195	
cat tct ggt gtg atg ggt gca gtg gtg gct cct ctg aca ata tta	700
His Ser Gly Val Met Gly Ala Val Val Ala Pro Leu Thr Ile Leu	
200 205 210	
ggg ggt cct ctt ctc atc aga gct gca tgg tac aca gct ggc att	745
Gly Gly Pro Leu Leu Ile Arg Ala Ala Trp Tyr Thr Ala Gly Ile	
215 220 225	
gtg gga ggc ctc tcc acf gtg gcc atg tgt gcg ccc agt gaa aag	790

Val Gly Gly Leu Ser Thr Val Ala Met Cys Ala Pro Ser Glu Lys	
230	240
ttt ctg aac atg ggt gca ccc ctg gga gtg ggc ctg ggt ctc gtc	835
Phe Leu Asn Met Gly Ala Pro Leu Gly Val Gly Leu Gly Leu Val	
245	255
ttt gtg tcc tca ttg gga tct atg ttt ctt cca cct acc acc gtg	880
Phe Val Ser Ser Leu Gly Ser Met Phe Leu Pro Pro Thr Thr Val	
260	270
gct ggt gcc act ctt tac tca gtg gca atg tac ggt gga tta gtt	925
Ala Gly Ala Thr Leu Tyr Ser Val Ala Met Tyr Gly Gly Leu Val	
275	285
ctt ttc agc atg ttc ctt ctg tat gat acc cag aaa gta atc aag	970
Leu Phe Ser Met Phe Leu Leu Tyr Asp Thr Gln Lys Val Ile Lys	
290	300
cgt gca gaa gta tca cca atg tat gga gtt caa aaa tat gat ccc	1015
Arg Ala Glu Val Ser Pro Met Tyr Gly Val Gln Lys Tyr Asp Pro	
305	315
att aac tcg atg ctg agt atc tac atg gat aca tta aat ata ttt	1060
Ile Asn Ser Met Leu Ser Ile Tyr Met Asp Thr Leu Asn Ile Phe	
320	330
atg cga gtt gca act atg ctg gca act gga ggc aac aga aag aaa	1105
Met Arg Val Ala Thr Met Leu Ala Thr Gly Gly Asn Arg Lys Lys	
335	345

tga agtgact cagcttcigg ctctctgct acatcaaata tcttgllaa tggggcagat 1165

atgcattaaa tagtllglac aagcagctll cgtlgaaglt tagaagataa gaaacalgic 1225

atcataatlla aatgttccgg taatgigaig cctcaggict gcc 1268

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の（a）または（b）の蛋白質；

（a）配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質；

（b）配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ毛髪の成長を調節する機能を有する蛋白質。

2. 以下の（a）または（b）のDNA

（a）配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA

（b）配列番号：2のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ毛髪の成長を調節する機能を有する蛋白質をコードするDNA。



## 第 1 図

## 配列 - 1

```

      10      20      30      40      50      60
gatccattat actcgatgct gagtatctac atggatacat taaatatatt tatgcgagtt 60
gcaactatgc tggcaacigg aggcaacaga aagaaatgaa gtgactcagc ttctggcttc 120
tctgctacat caaatatctt gtttaatggg gcagatatgc attaaatagt ttgtacaagc 180
agctttcgtt gaagttttaga agataagann catgcatca tatttaaagt ttccggtaat 240
gtgatgcctc aggtctgcct tttttctgga agaataaatg cagtaatcct ctcccaaata 300
agcacacaca inttcanttc tcatgttttg agtgatitt 339

```

## 配列 - 2

```

      10      20
cggtaatgtg atgcccacagg tctgcc 26

```

## 配列 - 3

```

      10      20      30
gaaggcaaca gacaggctcg acatggattg

```

## 配列 - 4

```

Gly Cys Val Arg Ser Ile Pro Tyr Asp Gln Ser Pro Gly Pro Lys His Leu
                        5                        10                        15

```

## 配列 - 5

```

      10      20
ttccacctat atgtacttag caggg 25

```

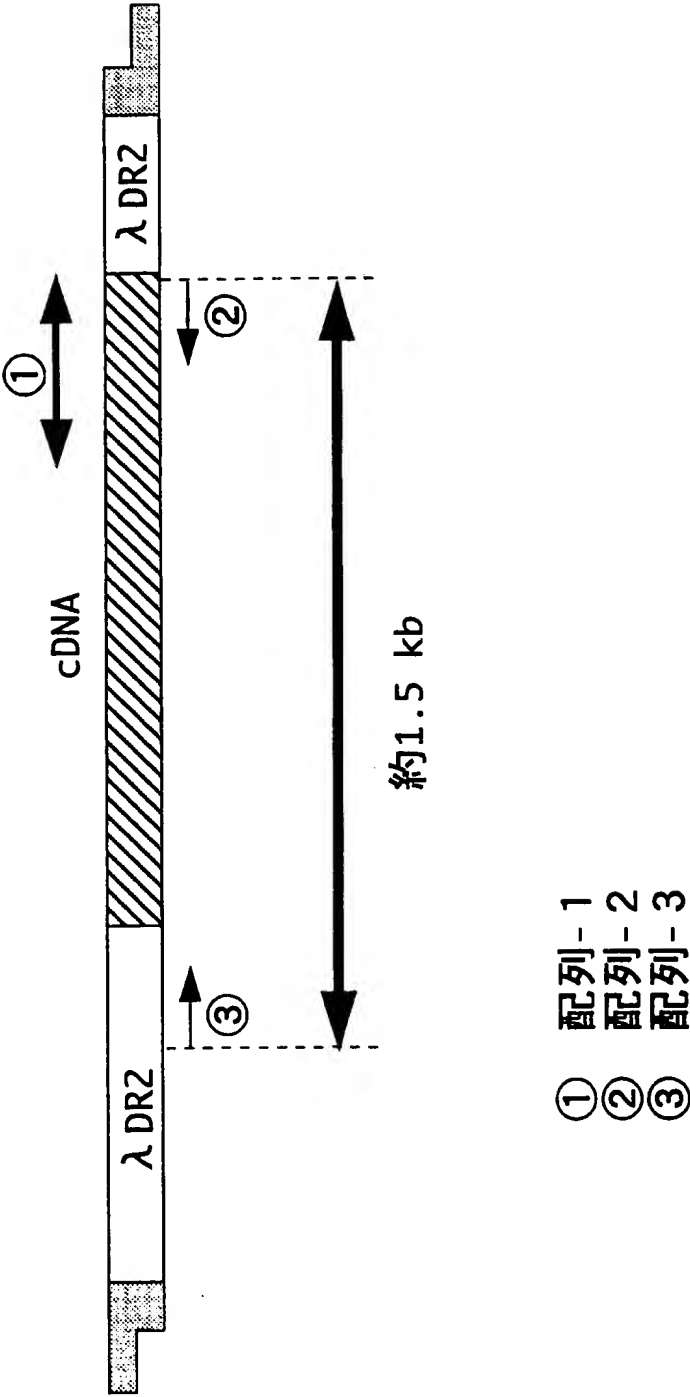
## 配列 - 6

```

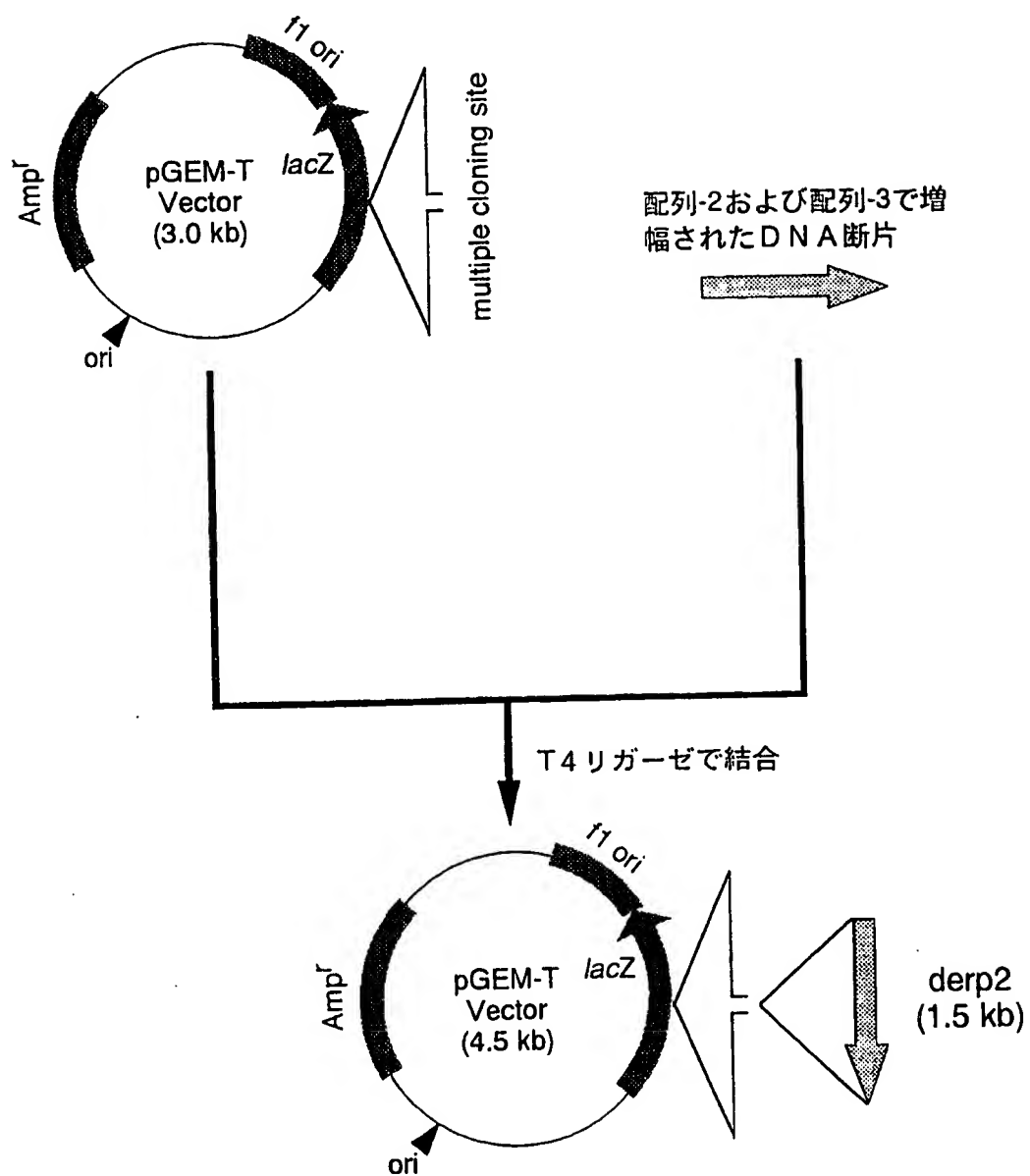
      10      20
agatactcag catcgagtta atggg 25

```

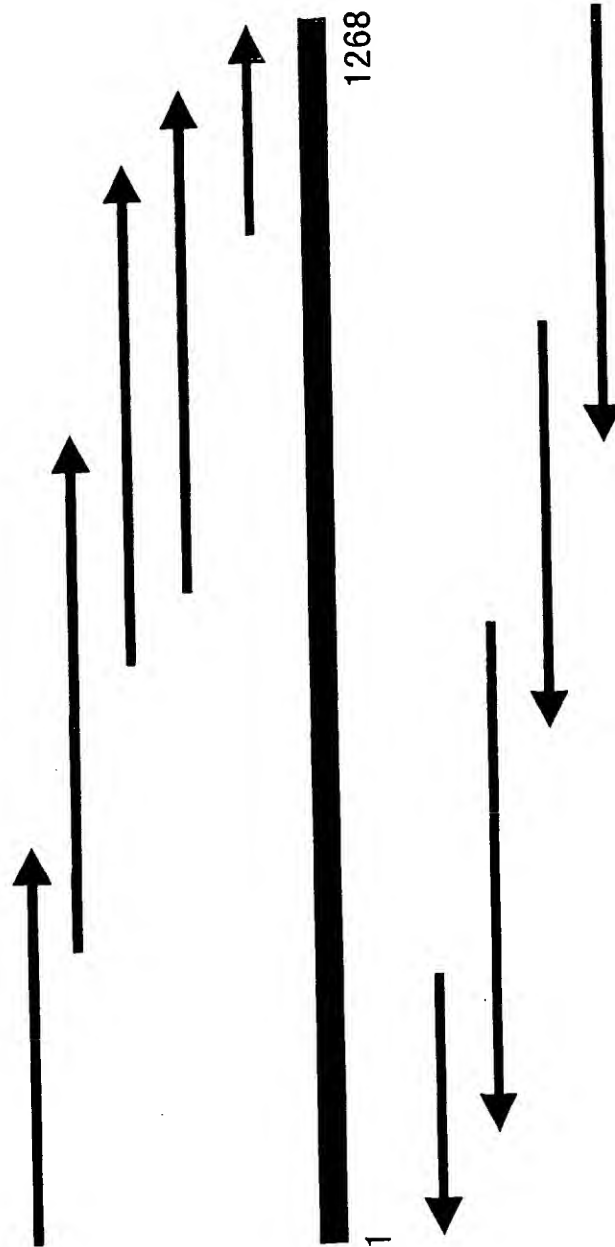
第2図



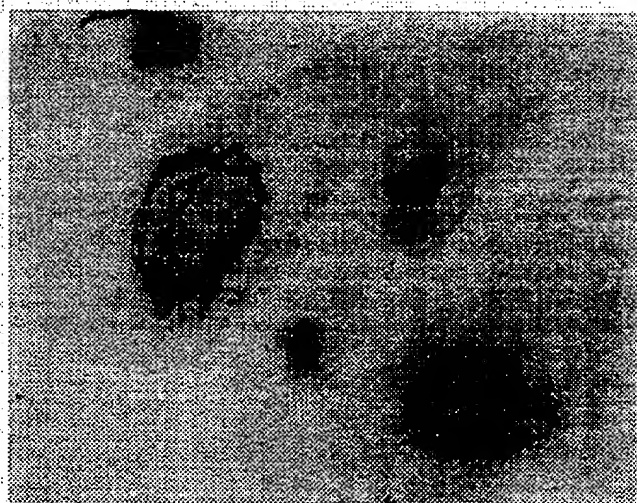
第3図



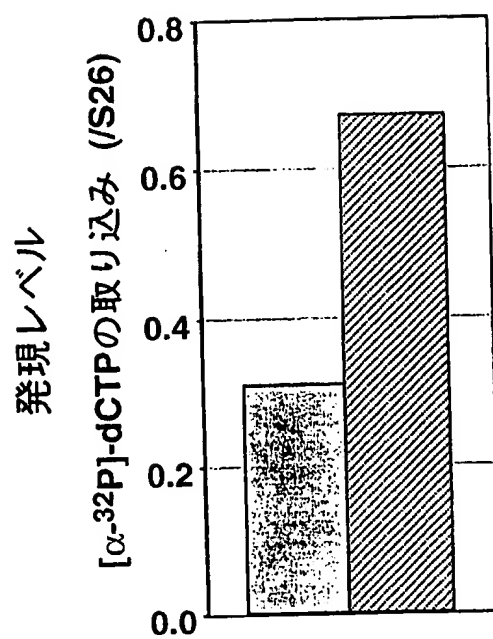
第4図



第5図

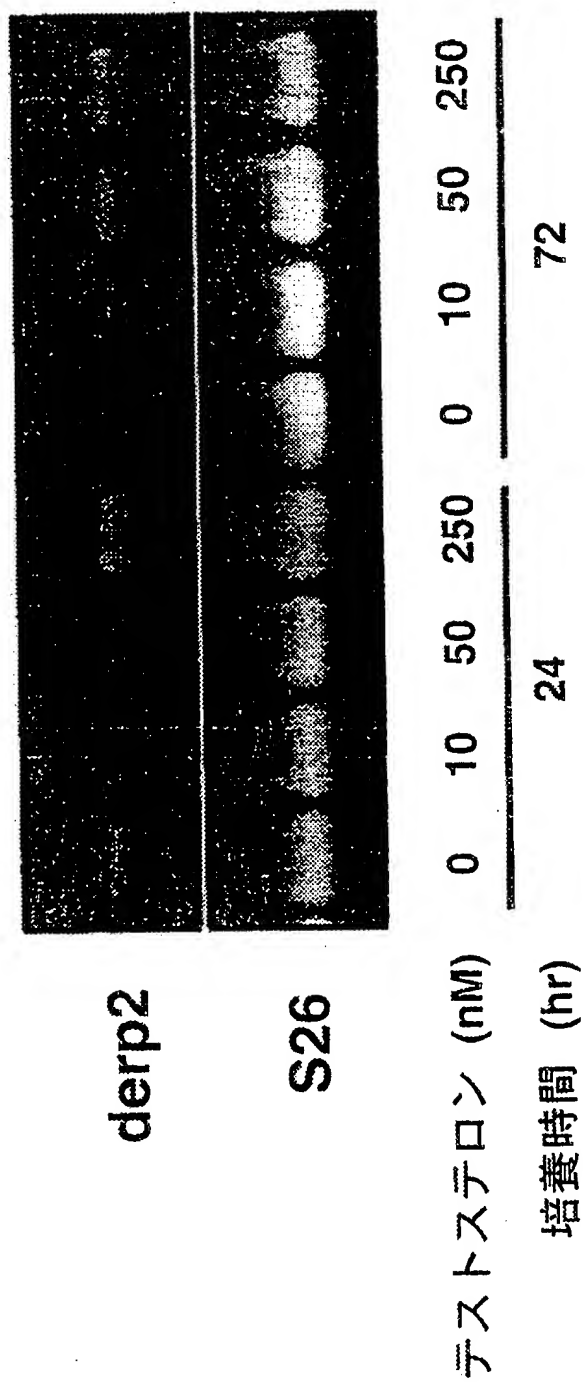


第6図



- 健常人発毛部由来毛乳頭細胞  
▨ 男性型脱毛症患者禿頭部由来毛乳頭細胞

第7図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02813

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 98/42741, A2 (GENETICS INST INC), 1 October, 1998 (01. 10. 98) & AU, 9867772, A	1-2
PX	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCI INC), 11 September, 1998 (11. 09. 98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A	1-2
A	Wei Yu et al., "Large-scale concatenation cDNA sequencing", Genome Research (1997) Vol. 7, No. 4 p.353-358	1-2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 August, 1999 (20. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, C07K 14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 98/42741, A2 (GENETICS INST INC) 1.10月.1998 (01.10.98) & AU, 9867772, A	1-2
P X	WO, 98/39448, A2 (HUMAN GENOME SCI INC) 11.9月.1998 (11.09.98) & AU, 9865453, A & AU, 9891304, A	1-2
A	Wei Yu et al. "Large-scale concatenation cDNA sequencing", Genome Research (1997) Vol.7, No.4 p.353-358	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**